PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes 6 : C07D 305/14, 407/12, A61K 49/00, 41/00 — A1

(11) Número de publicación internacional: WO 97/19938

(43) Fecha de publicación internacional: 5 de Junio de 1997 (05.06.97)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00231

(22) Fecha de la presentación internacional: 29 de Noviembre de 1996 (29.11.96)

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 9502361	29 de Noviembre de 1995 (29.11.95)	ES
P 9602522	29 de Noviembre de 1996 (29.11.96)	ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes *(sólo US)*: AMAT GUERRI, Francisco [ES/ES]; Instituto Química Orgánica General, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). SOUTO, Andre [ES/ES]; Instituto Química Orgánica General, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). ACUNA FERNANDEZ, Alberto Ulises [ES/ES]; Instituto Química Física Rocasolano, Serrano, 119, E-28006 Madrid (ES). ANDREU MORALES, José Manuel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES). BARASOAIN BLASCO, Mª Isabel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES). ABAL, Miguel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES).

(74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Consejo Superior Investigaciones Científicas, Serrano, 113, E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados: CA, JP, MX, NO, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publicada
Con informe de búsqueda internacional.

(54) Title: FLUORESCENT DERIVATIVES OF PACLITAXEL AND DOCETAXEL WITH ANTINEOPLASTIC ACTIVITY, METHOD FOR PRODUCING THEM AND THEIR APPLICATIONS

(54) Título: DERIVADOS FLUORESCENTES DE PACLITAXEL Y DOCETAXEL CON ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA, METODO PARA OBTENERLOS Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract

Intensively fluorescent derivatives have been synthesized from a substance used at present as anticancer (chemotherapy) agent, against ovarian and mammal tumors, and other tumors. Said derivatives enable to visualize the cellular target of said drug, since the derivatization does not modify the biological activity. There is no existing compound which has the solubility, activity and fluorescence characteristics of the compounds disclosed in the present invention. Said derivatives may be used as fluorescence microscopy colorants specific to microtubules of the cytoskeleton in cells and other living organisms. Said derivatives have many applications in the analysis of the cell anatomy and in clinical diagnosis.

(57) Resumen

Se ha sintetizado derivados intensamente fluorescentes de una sustancia utilizada actualmente como anticancerígeno (quimioterapia), contra tumores de ovario y mama entre otros. Estos derivados permiten visualizar la diana celular de dicho fármaco, ya que la derivatización no ha modificado la actividad biológica. No existe ningún compuesto que presente las características de solubilidad, actividad y fluorescencia de los aquí descrito. Dichos derivados se pueden usar como colorantes de microscopía de fluorescencia específicos de los microtúbulos del citoesqueleto en células y otros organismos vivos. Estos derivados tienen múltiples aplicaciones en el análisis de la anatomía celular y en el diagnóstico clínico.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	**GB**	Reino Unido	**MW**	Malawi
AT	Austria	**GE**	Georgia	**MX**	México
AU	Australia	**GN**	Guinea	**NE**	Níger
BB	Barbados	**GR**	Grecia	**NL**	Paises Bajos
BE	Bélgica	**HU**	Hungría	**NO**	Noruega
BF	Burkina Faso	**IE**	Irlanda	**NZ**	Nueva Zelandia
BG	Bulgaria	**IT**	Italia	**PL**	Polonia
BJ	Benin	**JP**	Japón	**PT**	Portugal
BR	Brasil	**KE**	Kenya	**RO**	Rumania
BY	Belarús	**KG**	Kirguistán	**RU**	Federación Rusa
CA	Canadá	**KP**	República Popular Democrática de Corea	**SD**	Sudán
CF	República Centroafricana			**SE**	Suecia
CG	Congo	**KR**	República de Corea	**SG**	Singapur
CH	Suiza	**KZ**	Kazajstán	**SI**	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Eslovaquia
CM	Camerún	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Senegal
CN	China	**LR**	Liberia	**SZ**	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	**LT**	Lituania	**TD**	Chad
CZ	República Checa	**LU**	Luxemburgo	**TG**	Togo
DE	Alemania	**LV**	Letonia	**TJ**	Tayikistán
DK	Dinamarca	**MC**	Mónaco	**TT**	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	**MD**	República de Moldova	**UA**	Ucrania
ES	España	**MG**	Madagascar	**UG**	Uganda
FI	Finlandia	**ML**	Mali	**US**	Estados Unidos de América
FR	Francia	**MN**	Mongolia	**UZ**	Uzbekistán
GA	Gabón	**MR**	Mauritania	**VN**	Viet Nam

1. Título

Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones

2. Sector de la técnica

1) farmacéutico-bioquímico; 2) compuestos para el análisis de la diana celular de los fármacos anticancerosos paclitaxel y docetaxel, y para la terapia anticancerosa directa o fotodinámica.

3. Estado de la técnica

Paclitaxel (o taxol, marca registrada por Brystol-Myers Squibb), un diterpenoide natural que se extrae de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, y su análogo de síntesis docetaxel (10-desacetil-3'-(N-desbenzoil)-3'-(N-tertbutiloxicarbonil)paclitaxel, o taxotere, marca registrada por Rhône-Poulenc) están actualmente entre las más prometedoras drogas anticancerosas debido a su capacidad para estabilizar los microtúbulos del citoesqueleto y, por consiguiente, para inhibir la división celular. Sin embargo, ambos fármacos presentan varios inconvenientes en su utilización en terapia humana, principalmente una solubilidad muy reducida en el plasma sanguíneo, así como varios efectos secundarios. Un buen número de laboratorios implicados en la lucha contra el cáncer dirigen actualmente su atención a la obtención de nuevos fármacos anticancerosos por modificación química de estas dos moléculas de taxanos, así como a la aclaración de su mecanismo de acción bioquímica. Algunos de los inventores de la presente patente han descrito las estructuras de los microtúbulos formados por la acción de paclitaxel (Andreu y cols., *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 169 y *J. Biol. Chem.* **1994**, *50*, 31785), el ensamblaje de GDP-tubulina en presencia de taxoides y la relación entre la reacción de unión de paclitaxel y la de formación de microtúbulos (Díaz y cols., *Biochemistry* **1993**, *32*, 2747 y 10067).

Para los investigadores que estudian los microtúbulos celulares y el mecanismo de acción de estas drogas sería de inmediata utilidad disponer de un derivado luminiscente (ya que ni paclitaxel ni docetaxel lo son) que, además,

fuese suficientemente soluble en agua. Esto permitiría: a) el estudio directo *in vivo*, mediante microscopía de fluorescencia, de los microtúbulos diana en los cultivos celulares, y b) disponer de una poderosa herramienta para estudiar el mecanismo molecular del ensamblaje de los microtúbulos inducido por estos taxanos, y para descubrir otras posibles dianas de las drogas dentro de la célula. Por otra parte, la observación directa, de una manera sencilla, de las células en las que el taxano ha ejercido su efecto permitiría desarrollar nuevos métodos de análisis y de diagnóstico relacionados con el tratamiento de pacientes con estas drogas. Además, las específicas propiedades fotoquímicas de los colorantes se podrían utilizar como ruta adicional en la destrucción de la célula cancerosa.

Algunos derivados fluorescentes de ambos taxanos se han descrito ya en la bibliografía. Sin embargo, el éxito de su aplicación a los anteriores objetivos ha sido hasta ahora muy limitado. Se ha descrito un derivado de paclitaxel que posee un grupo dansilo en la posición 7, unido a través de un grupo de β-alanina como espaciador (Kingston, *Pharmac. Ther.* **1991**, *52*, 1), aunque la bioactividad de este compuesto está pendiente de demostración. También se ha dado cuenta de dos derivados fluorescentes de paclitaxel con grupos amino en su molécula: uno con un grupo *m*-amino en el benzoílo en posición 2 (Han y cols., *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 284a), pero el derivado es menos activo que la droga de la que procede, y otro con un grupo *m*-dimetilamino en el benzoílo en posición 3' (Sengupta y cols., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 11889) cuya actividad biológica es similar a la de paclitaxel. La fluorescencia de estos dos aminoderivados es baja, aunque mayor que la del propio paclitaxel, y los valores de los coeficientes de extinción molar son pequeños. Esto hace que para su detección sea necesario utilizar altas concentraciones del derivado fluorescente. Cuando esto no es posible, dicha detección no se puede realizar. Asimismo se han descrito varios derivados fluorescentes de docetaxel con un grupo 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazo-4-ilo en la posición 7, o en la 3' de su derivado 3'-NH-desacilado, o bien con un grupo biotina en las posiciones 7, 10 o 3' (Dubois y cols., *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, *10*, 1357). En todos estos últimos compuestos los grupos fluorescentes están unidos al esqueleto de paclitaxel a través de un grupo 6-aminocaproico como espaciador. Sin embargo, sus actividades biológicas en células vivas parecen

discrepantes, y tiñen defectuosamente los microtúbulos celulares. Por último, existe comercialmente disponible (*Molecular Probes*, Holanda) un derivado de 3'-NH-desbenzoilpaclitaxel fluorescente (BODIPY-FL-Taxol, marca registrada) que posee un grupo de pirrometeno.BF_2 sustituido en el grupo NH en dicha posición 3', pero cuya solubilidad en agua es baja, lo que nuevamente limita considerablemente su empleo.

Una alternativa para visualizar el sistema de microtúbulos celulares consiste en utilizar las bien conocidas técnicas de inmunofluorescencia, por ejemplo mediante un anticuerpo fluorescente anti-tubulina. Estas técnicas, comercialmente disponibles, son indirectas, complejas y laboriosas, y permiten observar el sistema de microtúbulos sólo después de que éstos hayan interaccionado con el taxano. Obviamente, estas técnicas de inmunofluorescencia no podrían substituir a las basadas en una molécula de paclitaxel o docetaxel fluorescente, porque en aquellas los microtúbulos interaccionan con una proteína (IgG o sus fragmentos), y porque tanto la posición como la forma de actuación de dicha proteína y del taxano anticanceroso deben ser diferentes.

4. Descripción de la invención

4.1 La presente invención está basada en la obtención de derivados de los agentes anticancerosos paclitaxel y docetaxel que, además de conservar la bioactividad, emiten fluorescencia al ser excitados con luz visible. Esta propiedad permite, mediante microscopía de fluorescencia, detectar: a) las células que han reaccionado con la droga, y b) a qué parte de la célula se ha unido dicha droga. Los derivados de paclitaxel y de docetaxel cuya obtención y empleo aquí se patentan permiten además transportar al interior de la célula mayores concentraciones de la droga anticancerosa. Por otra parte, usando el mismo método de obtención, pueden unirse a la droga grupos moleculares que, al ser iluminados con luz visible, generen productos tóxicos para la célula.

4.2 Más concretamente, la invención describe la obtención y el empleo de derivados de paclitaxel o docetaxel que poseen un grupo cromóforo, unido al núcleo de la droga por la posición 7 a través de un espaciador. Es bien sabido que las modificaciones en el hidroxilo en esta posición 7 en la molécula de

paclitaxel no afectan apreciablemente a la actividad biológica de la droga. Los numerosos derivados aquí patentados se obtienen básicamente por un procedimiento químico que comprende dos pasos:

Primer paso: esterificación selectiva del grupo alcohólico en la posición 7 de la molécula de paclitaxel o docetaxel con ácidos carboxílicos que poseen en su molécula al menos un grupo amino primario libre. Esta reacción puede llevarse a cabo de diferentes modos, en general en varios pasos, siempre con aminoácidos con el grupo amino adecuadamente protegido, y con protección química adicional de los grupos del taxano que también puedan esterificarse. En la presente invención se ha usado preferentemente un procedimiento que comprende tres etapas, básicamente similares a las descritas por Mathew y cols en *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 145 para la esterificación en posición 7 de paclitaxel con L-alanina: 1) esterificación de los grupos alcohólicos en posiciones 7 y 2' de paclitaxel o docetaxel con un aminoácido con el grupo amino protegido (por ejemplo, con el grupo N-tertbutoxicarbonilo); 2) desprotección de ambos grupos amino en el diéster por reacción con ácido fórmico; y 3) hidrólisis acuosa selectiva del grupo éster en posición 2'. El aminoácido que se emplea para esterificar la posición 7 puede tener el grupo amino primario separado del carboxílico por una cadena de 1 a 18 carbonos, lineal o ramificada, o por un grupo fenileno, con o sin sustituyentes alquílicos, y puede ser cualquiera de los α-L-aminoácidos naturales conocidos, como glicina, alanina, prolina, etc, sus D-isómeros, las mezclas racémicas correspondientes, o cualquier compuesto que posea simultáneamente en su molécula los grupos ácido carboxílico y amino primario.

Segundo paso: unión covalente de un cromóforo luminiscente (fluorescente o fosforescente) a dicho grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel obtenido en el primer paso, mediante reacción con una molécula de un colorante que posee un grupo con reacción selectiva con grupos amino. El grupo específico de la molécula de colorante que reacciona con el grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel puede ser cualquiera de los que se conocen por su alta afinidad reactiva frente a aminas primarias, tales como isocianatos, isotiocianatos, succinimidilésteres, ácidos carboxílicos o sus haluros y ácidos sulfónicos o sus haluros. El colorante con el anterior grupo reactivo de aminas primarias es

siempre un derivado de otro colorante, elegido entre los de las familias de los colorantes fluorescentes: xantenos (fluoresceína, Floxina, Eosina, Eritrosina, Rosa de Bengala, etc), tiacinas (tionina, Azul de Metileno, Azure A, Azure B, etc), rodaminas (Rodamina B, Rodamina 3B, Rodamina 19, Rodamina 6G, Rodamina 101, Rodamina 123, etc), cumarinas, porfirinas, aminonaftalenos, hidrocarburos policíclicos, polienos, y complejos de pirrometenos con trifluoruro de boro, que se unen al derivado de paclitaxel o docetaxel por el grupo amino libre existente en el sustituyente en la posición 7 de la droga.

Las únicas limitaciones de las anteriores reacciones de esterificación en posición 7 con un aminoácido y posterior sustitución del grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel con un resto de colorante son:

1) las reacciones no deben alterar la estructura molecular del núcleo de paclitaxel o docetaxel, excepto en lo que se refiere a la esterificación de su posición 7, ni la del núcleo cromofórico del colorante;

2) las propiedades biológicas del derivado luminiscente de paclitaxel o docetaxel deben ser idénticas, o muy similares, a las del correspondiente taxano sin sustituir;

3) las propiedades de absorción y emisión de luz del cromóforo unido a la molécula de paclitaxel deben ser muy similares a las del colorante correspondiente en estado libre;

4) las propiedades de solubilidad en agua del derivado de paclitaxel o docetaxel finalmente obtenido deben ser tales que permitan su rápido paso a través de la membrana celular, sí como su fácil disolución en el medio acuoso citoplasmático.

Una interesante aplicación de todos estos derivados es el empleo como fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica anticancerosa, especialmente los derivados que llevan incorporados cromóforos que poseen altos rendimientos cuánticos en la generación de la especia activa oxígeno molecular singlete. Esta aplicación está basada en la capacidad de paclitaxel y docetaxel para atravesar la membrana celular y unirse a la tubulina y a los microtúbulos del citoesqueleto. La célula así marcada puede ser irradiada con luz visible, que seria absorbida por el cromóforo unido al taxano, dando lugar a la generación de oxígeno singlete, un

fuerte oxidante que provocaría la destrucción, no sólo de la célula marcada, sino también de las que se encuentren próximas.

Otras aplicaciones

Algunos de los derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel descritos en esta patente poseen una propiedad excepcional: traspasan con facilidad la membrana celular externa y se unen de forma permanente a los microtúbulos del citoesqueleto celular conservando la intensa fluorescencia. Esto hace que sea posible utilizar estos derivados específicos de paclitaxel y docetaxel en concentraciones muy bajas, por debajo de micromolares. Los inventores de esta patente han descubierto que en estas condiciones los microtúbulos del citoesqueleto celular y cualquier estructura celular conteniendo tubulinas (x y ¡¯3 (cilios, flagelos, etc.) permanecen estructural y funcionalmente intactos, pese a que son perfectamente observables a través de la intensa emisión de fluorescencia del derivado de paclitaxel o docetaxel que se encuentra unido específicamente a dichas estructuras

Esto hace posible que la célula o el organismo celular siga ¯esarrollan¯o todas sus funciones biológicas sin alteración (crecimiento, reproducción, metabolismo, movilidad, etc.). Como, simultáneamente, la parte fluorescente del derivado mantiene la intensa luminosidad, este método permite observar y caracterizar la célula u organismo mediante técnicas de detección y visualización de la intensidad de la luz emitida.

En esta forma, los derivados fluorescentes citados de paclitaxel y docetaxel se pueden utilizar como nuevos colorantes específicos celulares de fluorescencia, de uso simple y directo, apropiados para la tinción de una gran variedad de células y organismos sin alterar su viabilidad.

A título ilustrativo, y sin que sea considerado como limitación al alcance de la presente patente, se indica que se ha aplicado el derivado paclitaxel-alanina-fluoresceína en la tinción fluorescente de microtúbulos en células vivas, epiteliales y de tejido nervioso, así como en la tinción de organismos unicelulares vivos,

como el *Trypanosoma cruci*. Hay que destacar que actualmente no existe ningún método comercialmente disponible para la tinción fluorescente de los microtúbulos del citoesqueleto que permita observar las células u organismos *in vivo*, es decir, sin alterar sus funciones vitales.

Esta novedosa y excepcional propiedad de los derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel es el fundamento de las siguientes aplicaciones:

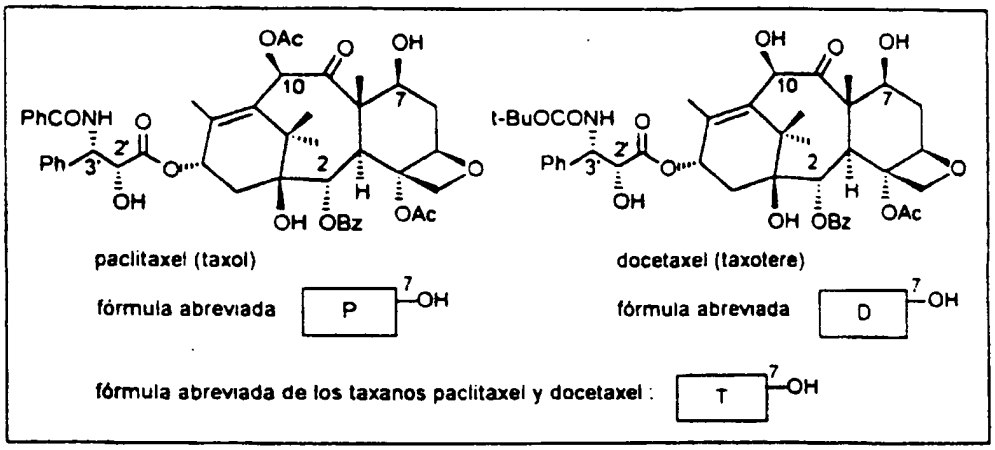
a) nuevos métodos de análisis y diagnóstico de enfermedades relacionadas con organismos celulares dotados de cilios y/o flagelos, fácilmente identificables a través de la observación y detección de sus sistemas característicos de microtúbulos y de su evolución temporal;

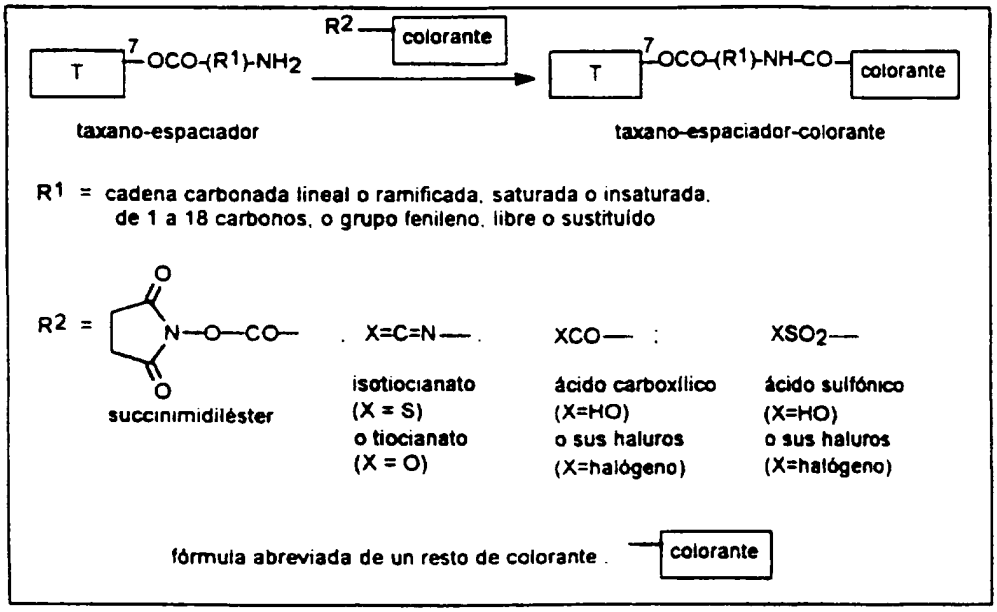
b) nuevos métodos, de análisis y diagnóstico de enfermedades en las que se producen alteraciones o destrucción del sistema y tejidos nerviosos, fácilmente identificables a través de la observación y detección de los sistemas característicos de microtúbulos;

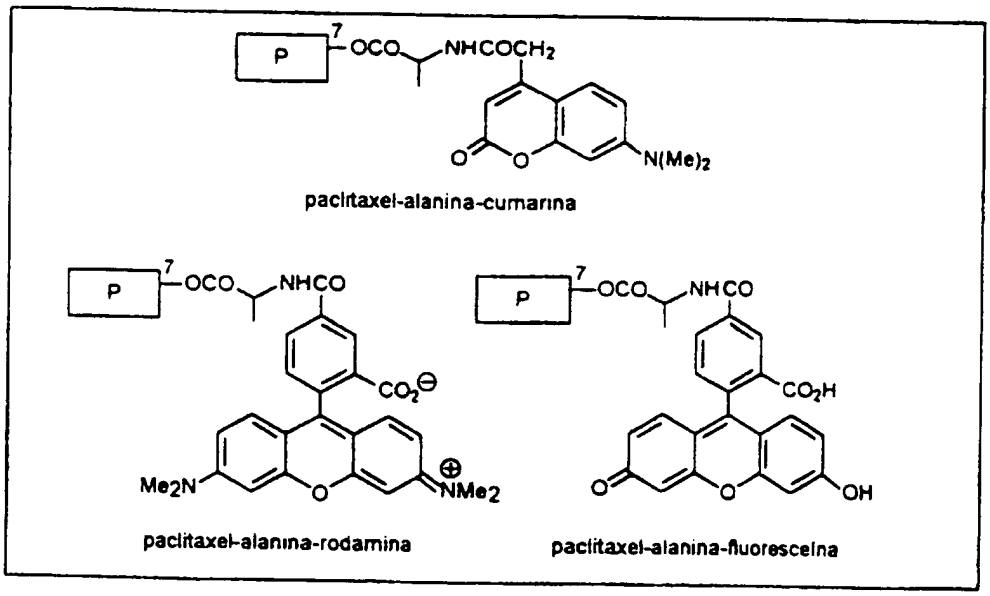
c) nuevos métodos de estudio, clasificación, observación y seguimiento de cualquier célula u organismo celular que contenga microtúbulos o tubulinas α y β.

5. Descripción del esquema

El esquema muestra las estructuras moleculares de paclitaxel y docetaxel, las correspondientes moléculas conteniendo el espaciador $-CO-R^1-NH_2$ en la posición 7, y la estructura resultante de unir un colorante genérico, R^2-colorante, por reacción con el grupo NH_2 del espaciador, así como los posibles grupos R^2 con reacción selectiva con grupos aminos primarios. La parte inferior del esquema muestra las estructuras de los tres derivados de paclitaxel que sirven de ejemplo en esta invención, con el cromóforo de una cumarina, una rodamina o fluoresceína en la molécula.


paclitaxel (taxol)
docetaxel (taxotere)
fórmula abreviada
P
D
T
OH
fórmula abreviada de los taxanos paclitaxel y docetaxel :


colorante
taxano-espaciador
taxano-espaciador-colorante
R1 = cadena carbonada lineal o ramificada, saturada o insaturada, de 1 a 18 carbonos, o grupo fenileno, libre o sustituido
R2 =
succinimidiléster
X=C=N—
isotiocianato (X = S) o tiocianato (X = O)
XCO—
ácido carboxílico (X=HO) o sus haluros (X=halógeno)
XSO2—
ácido sulfónico (X=HO) o sus haluros (X=halógeno)
fórmula abreviada de un resto de colorante



6. Ejemplos de realización

A título ilustrativo, y sin que sea considerado como limitación al alcance de la presente patente, a continuación se ilustran ejemplos de la unión química de tres colorantes, una cumarina, una rodamina y un xanteno, a la posición 7 de la molécula de paclitaxel, a través de un espaciador de L-alanina, así como un ejemplo práctico del empleo de uno de ellos, el derivado con el grupo fluoresceína, para la visualización de los microtúbulos celulares. Se han elegido estos tres fluoróforos porque muestran propiedades químicas, espectroscópicas y fotofísicas que son óptimas para los fines perseguidos en la presente invención: altos coeficientes de absorción a longitudes de onda alejadas de la absorción intrínseca de las proteínas, y próximas a los máximos de emisión de los láseres

comerciales disponibles, así como altos rendimientos en la emisión de fluorescencia, y valor elevado de la polarización de la emisión (anisotropía).

Ejemplo 1: *Obtención de paclitaxel-alanina-cumarina* (ver fórmula)

A una disolución de 7-(L-alanil)paclitaxel sin purificar (10 mg, 10.8 mmol) (obtenido a partir de paclitaxel, con un rendimiento total del 70 %, siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Mathew y cols., *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 145), y trietilamina (15 µL, 108 µmol) en dioxano (1 mL) se añade otra de 7-dimetilaminocumarin-4-acetato de succinimidilo comercial (5.6 mg, 16.2 µmol) en dioxano (0.5 mL). Tras agitar durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad, el disolvente se elimina a vacío. El producto crudo paclitaxel-alanina-cumarina se purifica por cromatografía en capa fina preparativa (gel de sílice, acetato de etilo-diclorometano 1:1 como eluyente). Rendimiento: 9.5 mg (77 %). Punto de fusión: 182-185ºC. Pureza por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) > 96 % (columna C-4, desde el 20 al 80 % de acetonitrilo en agua como eluyente). Solubilidad en agua: 1 µM. El producto se identifica por espectrometría de masas con bombardeo de átomo pesado (MS-FAB$^+$) y por resonancia magnética nuclear de protón.

Ejemplo 2: *Obtención de paclitaxel-alanina-rodamina* (ver fórmula)

A una disolución de 7-(L-alanyl)paclitaxel sin purificar (10 mg, 10.8 mmol) (obtenido como se dice antes) en una mezcla de dimetilformamida (1 mL) y tampón acuoso de pH 9 (carbonato/bicarbonato) (1 mL) se añade otra disolución de tetrametilrodamina-4'-carboxilato de succinimidilo comercial (8.6 mg , 16.2 mmol) en la misma mezcla de disolventes (1 mL). Tras agitar 2 horas, se separa el disolvente a vacío, y el producto crudo paclitaxel-alanina-rodamina se purifica por cromatografía en capa fina preparativa (gel de sílice, acetato de etilo-diclorometano 1:4). Rendimiento: 7.9 mg (55 %). Pureza (por HPLC, condiciones como antes) > 92 %. El producto se identifica como antes.

Ejemplo 3: *Obtención de paclitaxel-alanina-fluoresceína* (ver fórmula)

Siguiendo las mismas condiciones, proporciones y método de purificación que en el caso de la obtención del derivado paclitaxel-alanina-rodamina, se obtienen 8.0 mg (60 %) de producto. Punto de fusión > 300ºC. Pureza (HPLC) > 92 %. Solubilidad en agua: 300 µM (solubilidad de paclitaxel en el mismo medio:

5 μM, según Nicolaou y cols., *Nature* **1993**, *364*, 464). El producto se identifica como antes.

Ejemplo 4: *Observación mediante microscopía de fluorescencia de los microtúbulos celulares con ayuda del colorante vital paclitaxel-alanina-fluoresceína*

Células PtK2 se tratan con el derivado paclitaxel-alanina-fluoresceina (1 μM), se lavan con disolución salina de tampón de fosfato, se montan sin fijación en una disolución de tampón de glicina 0.13 M de pH 8.6, cloruro sódico 0.20 M y glicerina al 70% (de acuerdo con lo descrito por Inés y cols., *Cancer Res.* **1994**, *54*, 75), y se observan con un microscopio de epi-fluorescencia. Los microtúbulos citoplásmicos son perfectamente visibles, así como los husos en las células en proceso de división. La calidad de la imagen es al menos semejante a la que se obtiene mediante procedimientos habituales de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-tubulina sobre células fijadas, distinguiéndose microtúbulos individuales.

7. Reivindicaciones

1 - **Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones.** Estos derivados se caracterizan porque contienen en su molécula un grupo cromofórico luminiscente unido a la molécula original del taxano por la posición 7 a través de un espaciador.

2 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque el método para obtenerlos posee dos etapas consecutivas. En la primera etapa el grupo alcohólico en la posición 7 del taxano se esterifica selectivamente con un ácido carboxílico que tiene en su molécula un grupo amino primario. En la segunda etapa se hace reaccionar el aminoderivado del taxano, obtenido en la primera etapa, con un colorante que posee en su molécula un grupo con reacción selectiva con grupos aminos primarios. Los grupos amino primario y ácido carboxílico en el aminoácido están separados por una cadena de 1 a 18 carbonos, lineal o ramificada, o por un grupo fenileno, con o sin sustituyentes alquílicos. Dicho aminoácido puede ser cualquiera de los α-L-aminoácidos naturales conocidos, como glicina, alanina, prolina, etc, sus D-isómeros, las mezclas racémicas correspondientes, o cualquier compuesto que posea simultáneamente en su molécula los grupos ácido carboxílico y amino primario. El grupo con reacción selectiva con grupos aminos primarios puede ser isocianato, isotiocianato, succinimidiléster, ácido carboxílico o haluro de ácido carboxílico, y ácido sulfónico o haluro de ácido sulfónico. El colorante con el anterior grupo reactivo de aminas primarias es siempre un derivado de otro colorante, elegido entre los de las familias de los colorantes xanténicos (fluoresceína, Floxina, Eosina, Eritrosina, Rosa de Bengala), las tiacinas (tionina, Azul de Metileno, Azure A, Azure B), las rodaminas (Rodamina B, Rodamina 3B, Rodamina 19, Rodamina 6G, Rodamina 101, Rodamina 123, Rojo Texas), cumarinas, porfirinas, aminonaftalenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno), polienos lineales o ramificados con un mínimo de tres dobles enlaces conjugados, y complejos de pirrometenos con trifluoruro de boro.

3 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque poseen bioactividad similar y más alta solubilidad en agua que el taxano del que derivan.

4 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque emiten fluorescencia o fosforescencia, o porque generan especies químicas citotóxicas al ser iluminados, cuando se encuentran unidos al sistema de microtúbulos de células benignas o malignas.

5 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque las propiedades electrónicas del grupo cromóforo existente en su molécula son adecuadas para nuevos métodos de análisis y nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades cancerosas, así como para la terapia fotodinámica anticancerosa.

6 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque las propiedades del grupo cromóforo existente en su molécula son adecuadas para su aplicación, mediante técnicas ópticas de fluorescencia, en la observación, clasificación y seguimiento de células u organismos celulares vivos, sin alteración de sus funciones biológicas, mediante la tinción específica fluorescente de su citoesqueleto, flagelos, cilios, u otras estructuras que contienen, o están microtúbulos.

7. Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, reivindicación 1, caracterizados porque sus propiedades químicas y fluorescentes son adecuadas para nuevos métodos de análisis y diagnóstico de enfermedades producidas por microorganismos unicelulares, por alteraciones del tejido nervioso y, en general, por cualquier proceso físico, químico y/o biológico que pueda detectarse a través

de la observación específica del sistema de microtúbulos y de sus cambios y transformaciones.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC^6: C07D 305/14, C07D 407/12, A61K 49/00, 41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC^6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SOUTO et al: New fluorescent water-soluble taxol derivatives, Angewandte Chemie, International Edition, Vol. 34, n^o 23/24, 5 January 1996, pages 2710-2712	1-7
A	MATHEW et al: Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with anti-tumoractivity J. Med. Chem. Vol. 35, n^o 1, 10 January 1992, pages 145-151, see page 146; example 10, abstract.	1-7
A	SENGUPTA et al: Interaction of a fluorescent Paclitaxel Analogue with Tubulin, Biochemistry, Vol. 34, n^o 37, 1995, pag.11889-11894, see page 11890; fig.1; see abstract	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 February 1997 (25.02.97)	4 March 1997 (04.03.97)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O. Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 96/00231

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP[6] C07D 305/14, C07D 407/12, A61K 49/00, 41/00
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP[6]

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	SOUTO et al: New fluorescent water-soluble taxol derivatives, Angewandte Chemie, International Edition, Vol. 34, nº 23/24, 05.01.96, páginas 2710-2712	1-7
A	MATHEW et al: Synthesis and evaluation of some water-soluble produgs and derivatives of taxol with antitumoractivity J. Med. Chem. Vol. 35, nº 1, 10.01.92, páginas 145-151 Ver página 146; ejemplo 10; resumen	1-7
A	SENGUPTA et al: Interaction of a fluorescent Paclitaxel Analogue with Tubulin, Biochemistry, Vol. 34, nº 37, 1995, pág. 11889-11894, ver página 11890; fig. 1; ver resumen	1-7

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" documentos anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del Informe de Búsqueda Internacional
25 Febrero 1997 (25.02.97)	04 Marzo 1997 (04.03.97)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. nº de fax +34 1 3495304	Funcionario autorizado MARTA OJANGUREN nº de teléfono +34 1 3495474

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (julio 1992)

1. Title

Fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel with antineoplasic activity, method for obtaining same and their applications.

2. Sector of the art

1) pharmaceutical-biochemical; 2) compounds for the analysis of the target cell of the anticancer drugs paclitaxel and docetaxel and for direct or photodynamic anticancer therapy.

3. State of the art

Paclitaxel (or taxol, trademark registered by Brystol-Myers Squibb), a natural diterpenoid extracted from the bark of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*, and its synthesis analogue docetaxel (10-desacetyl-3'-(N-desbenzoyl)-3'-(N-tertbutyloxycarbonyl))paclitaxel, or taxotere, trademark registered by Rhône-Poulenc) are currently among the most promising anticancer drugs on account of their capacity to stabilise the microtubules of the cytoskeleton, and as a consequence to inhibit cell division. Nevertheless, both drugs display certain drawbacks to their use in human therapy, primarily a very low solubility in the blood plasma, along with various side effects. A good number of laboratories involved in the fight against cancer are currently directing their attention towards obtaining new anticancer drugs by chemically modifying these two molecules of taxanes, along with clarifying their mechanism of biochemical action. Some of the inventors of the present patent have described the structures of the microtubules formed by the action of paclitaxel (Andreu et al., *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 169 and *J. Biol. Chem.* **1994**, *50*, 31785), the GDP-tubulin assembly in the presence of taxoids and the relation between the bonding reaction of paclitaxel and that of microtubules formation (Diaz et al., *Biochemistry.* **1993**, *32*, 2747 and 10067).

For researchers studying cell microtubules and the action mechanism of these drugs, it would be of immediate utility to have a luminescent derivative (since neither paclitaxel nor docetaxel are so) which, moreover, would be sufficiently soluble in water. This would permit: a) the direct study *in vivo,* by means of fluorescence microscope, of the target microtubules in cell cultures, and b) a powerful tool to be had for studying the molecular mechanism in the

microtubules assembly induced by these taxanes, and for discovering other possible targets of the drugs inside the cell. Moreover, direct observation in a simple way of the cells in which the taxane has exercised its effect would allow new methods of analysis and diagnosis to be developed related to the treatment of patients with these drugs. Furthermore, the specific photochemical properties of the dyes could be used as an additional route in the destruction of the cancer cell.

Some fluorescent derivatives of both taxanes have already been described in the literature. Nevertheless, the success of their application to the above objectives has so far been very limited. A paclitaxel derivative has been described which possesses a dansyl group in position 7, attached via a β-alanine group as spacer (Kingston, *Parmac. Ther.* **1991** *52,* 1), though the bioactivity of these compound has yet to be demonstrated. Two fluorescent derivatives of paclitaxel with amino groups in its molecule have also been reported: one with an *m*-amino group in the benzoyl in position 2 (Han et al., *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 284a), though the derivative is less active than the drug from which it comes, and the other with an *m*-dimethylamino group in the benzoyl in position 3' (Sengupta et al., *Biochemistry* **1995**, *34*, 11889), whose biological activity is similar to that of paclitaxel. The fluorescence of two amino-derivatives is low, though greater than paclitaxel itself, and the values of the molar extinction coefficients are small. These means that high concentrations of the fluorescent derivative are needed in order to detect them. When this is not possible, then the detection cannot be performed. Various fluorescent derivatives of docetaxel have also been described with a 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazo-4-yl group in position 7, or in 3' of its derivative 3'-NH-desacylate, or with a biothine group in positions 7, 10 or 3' (Dubois et al., *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *10*, 1357). In all these latter compounds the fluorescent groups are attached to the paclitaxel skeleton via a 6-aminocaproic group as spacer. Nevertheless, their biological activities in live cells seem discrepant, and they defectively stain the cell molecules. Finally, there exists a commercially available (*Molecular Probes*, Holland) fluorescent derivative of 3'-NH-desbenzoylpaclitaxel (BODIPY-FL-Taxol, registered trademark) which possesses a pyrromethene.BF_2 group, substituted in the NH group in the said position 3', but whose solubility in water is low, which again considerably limits its use.

An alternative for visualising the cellular microtubules system consists of using the well-known techniques of immunofluorescence, for example by means of an anti-tubulin fluorescent antibody. These techniques, which are commercially available, are indirect, complex and laborious, and they permit the microtubules system to be observed only after the microtubules have interacted with the taxane. Obviously, these immunofluorescence techniques could not replace those based on a molecule of fluorescent paclitaxel or docetaxel because in the former the microtubules interact with a protein (IgG or its fragments), and because both the position and the manner of action of that protein and of the anticancer taxane have to be different.

4. Description of the invention

4.1 The present invention is based on obtaining derivatives of the anticancer agents paclitaxel and docetaxel which, as well as conserving their bioactivity, emit fluorescence when excited with visible light. By means of fluorescence microscopy, this property permits detection of: a) the cells which have reacted with the drug, and b) which part of the cell the drug has attached itself to. The derivatives of paclitaxel and docetaxel whose obtention and use is being patented here also permit greater concentrations of the anticancer drug to be transported to the interior of the cell. Moreover, using the same method of obtention, molecular groups can be attached to the drug which, when illuminated with light, generate products that are toxic for the cell.

4.2 More specifically, the invention describes the obtention and use of derivatives of paclitaxel and docetaxel which possess a chromophore group, attached to the nucleus of the drug in position 7 via a spacer. It is well known that modifications to the hydroxyl in this position 7 in the paclitaxel molecule do not appreciably affect the biological activity of the drug. The numerous derivatives patented here are basically obtained by a chemical procedure comprising two steps:

Step one: selective esterification of the alcohol group in position 7 of the molecule of paclitaxel or docetaxel with carboxylic acids possessing at least one free primary amino group in their molecule. This reaction can be carried out in different ways, generally speaking in various steps, always with amino acids with the amino group adequately protected, and with additional chemical

protection of the groups of the taxane which can also be esterified. In the present invention, a procedure has preferentially been used consisting of three steps, basically similar to those described by Mathew et al., *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 145 for the esterification on position 7 of paclitaxel with L-alanine: 1) esterification of the alcohol groups in positions 7 and 2' of paclitaxel or docetaxel with an amino acid with the amino group protected (for example, with the group N-tertbutoxycarbonyl); 2) deprotection of both amino groups in the diester by reaction with formic acid; and 3) selective aqueous hydrolysis of the ester group in position 2'. The amino acid that is used for esterifying position 7 can have the primary amino group separate from the carboxylic group by a chain of from 1 to 18 carbon atoms, linear or branched, or by a phenylene group, with or without alkyl substituents, and it can be any of the known natural α-L-amino acids, such as glycine, alanine, proline, etc., their D-isomers, the corresponding racemic mixtures, or any compound which simultaneously possesses the carboxylic acid and primary amino groups in its molecule.

Step two: covalent bonding of a luminescent chromophore (fluorescent or phosphorescent) to that amino group of the paclitaxel or docetaxel derivative obtained in step one, by means of reaction with a molecule of a dye which possesses a group with selective reaction with amino groups. The specific group of the dye molecule which reacts with the amino group of the paclitaxel or docetaxel derivative can be any of those known for their high reactive affinity towards primary amines, such as isocyanates, isothiocyanates, succinimidylesters, carboxylic acids or their halides and sulphonic acids or their halides. The dye with the above reactive group of primary amines is always a derivative of another dye, chosen from among those of the family of fluorescent dyes: xanthenes (fluorescein, Floxin, Eosin, Erythrosin, Rose Bengal, etc.), thiacines (thionine, Methylene Blue, Azure A, Azure B, etc.), rhodamines (Rhodamine B, Rhodamine 3B, Rhodamine 19, Rhodamine 6G, Rhodamine 101, Rhodamine 123, etc.), cumarins, porphyrins, aminonaphthalenes, polycyclic hydrocarbons, polyenes and complexes of pyrromethene with boron trifluoride, which bond to the paclitaxel or docetaxel derivative via the free amino group existing in the substituent in position 7 of the drug.

The only limitations of the above esterification reactions in position 7 with an amino acid and subsequent substitution of the amino acid of the paclitaxel or docetaxel derivative with a dye remnant are:

1) the reactions must not alter the molecular structure of the nucleus of the paclitaxel or docetaxel, except with regard to the esterification of its position 7, nor that of the chromophore nucleus of the dye;

2) the biological properties of the luminescent derivative of paclitaxel or docetaxel must be identical, or very similar, to those of the corresponding unsubstituted taxane;

3) the light absorption and emission properties of the chromophore bonded to the paclitaxel molecule must be very similar to those of the corresponding dye in the free state;

4) the solubility properties in water of the paclitaxel or docetaxel derivative finally obtained must be such that they permit its rapid passage through the cell membrane, along with its easy dissolution in the cytoplasmatic aqueous medium.

One interesting application of all these derivatives is their use as photosensitisers for photodynamic anticancer therapy, especially derivatives which incorporate chromophores possessing high quantum yields in the generation of the singlet molecular oxygen active species. This application is based on the capacity of paclitaxel and docetaxel to pass through the cell membrane and become attached to the tubulin and to the microtubules of the cytoskeleton. The cell thus marked can be irradiated with visible light, which would be absorbed by the chromophore attached to the taxane, giving rise to the generation of singlet oxygen, a powerful oxidising agent which would provoke the destruction not just of the marked cell but also of those in the vicinity.

Other applications

Some of the fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel described in this patent possess an exceptional property: they easily pass through the outer cell membrane and become permanently attached to the microtubules of the cellular cytoskeleton conserving the intense fluorescence. This makes it possible to use these specific derivatives of paclitaxel and docetaxel in very low concentrations, below the micromolar level. The inventors of this patent have discovered that in these conditions the microtubules of the cellular cytoskeleton and any cell structure containing tubules (cilia, flagella, etc.) remain structurally

and functionally intact, in spite of the fact that they are perfectly observable by means of the intense emission of fluorescence from the paclitaxel or docetaxel derivative which is specifically attached to those structures.

This makes it possible for the cell or the cellular organism to continue to develop all its biological functions without alteration (growth, reproduction, metabolism, mobility, etc.). As the fluorescent part of the derivative simultaneously maintains the intense luminosity, this method allows the cell or organism to be observed and characterised by means of techniques for detection and visualisation of the intensity of the emitted light.

In this way, the cited fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel can be used as new specific cellular dyes for fluorescence, having simple and direct use, suitable for staining a wide variety of cells and organism without altering their viability.

By way of illustration, and without being considered as a limitation on the scope of the present invention, it is stated that the derivative paclitaxel-alanine-fluorescein has been applied in the fluorescent staining of microtubules in live cells, epithelials and nervous tissue, as well as in the staining of live unicellular organisms such as *Trypanosoma cruci.* It has to be emphasised that there does not currently exist any commercially available method for the fluorescent staining of microtubules of the cytoskeleton which would permit cells or organisms to be observed *in vivo*, in other words, without altering their vital functions.

This novel and exceptional property of fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel is the basis of the following applications:

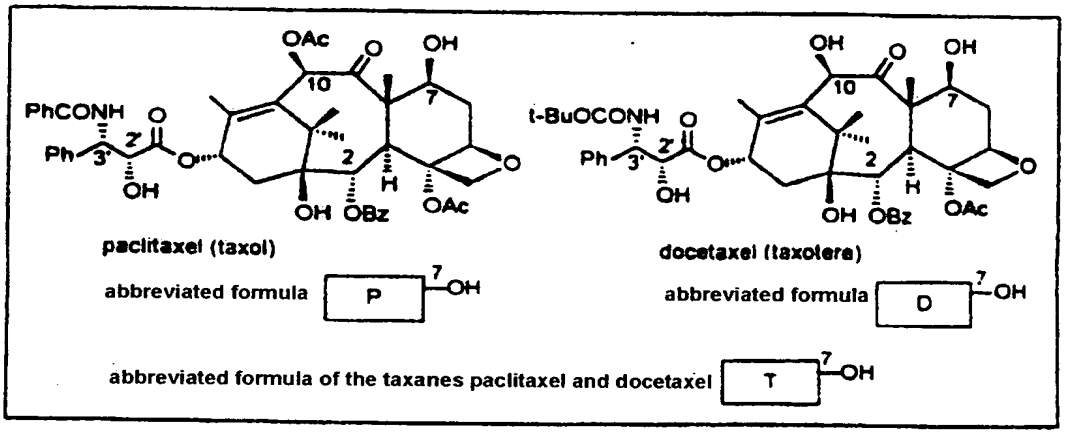
a) new methods of analysis and diagnosis of diseases related to cellular organism endowed with cilia and/or flagella, easily identifiable via the observation and detection of their characteristic systems of microtubules and their evolution with time;

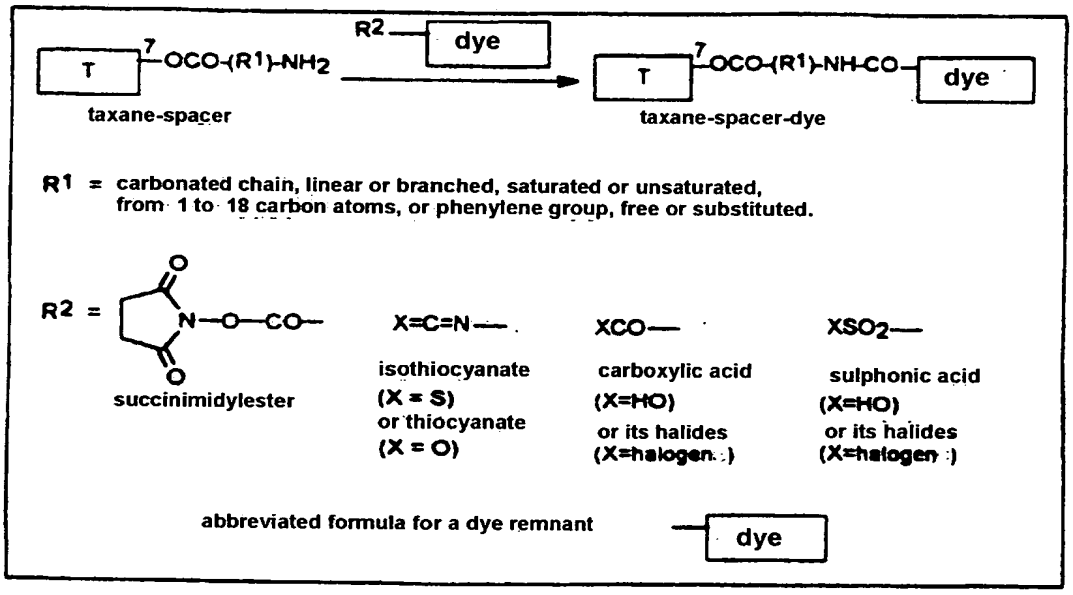
b) new methods of analysis and diagnosis of diseases in which alterations or destruction of the nervous system and tissues take place, easily identifiable via the observation and detection of the characteristic systems of microtubules;

c) new methods of study, classification, observation and monitoring of any cell or cellular organism containing α and β microtubules or tubulins.

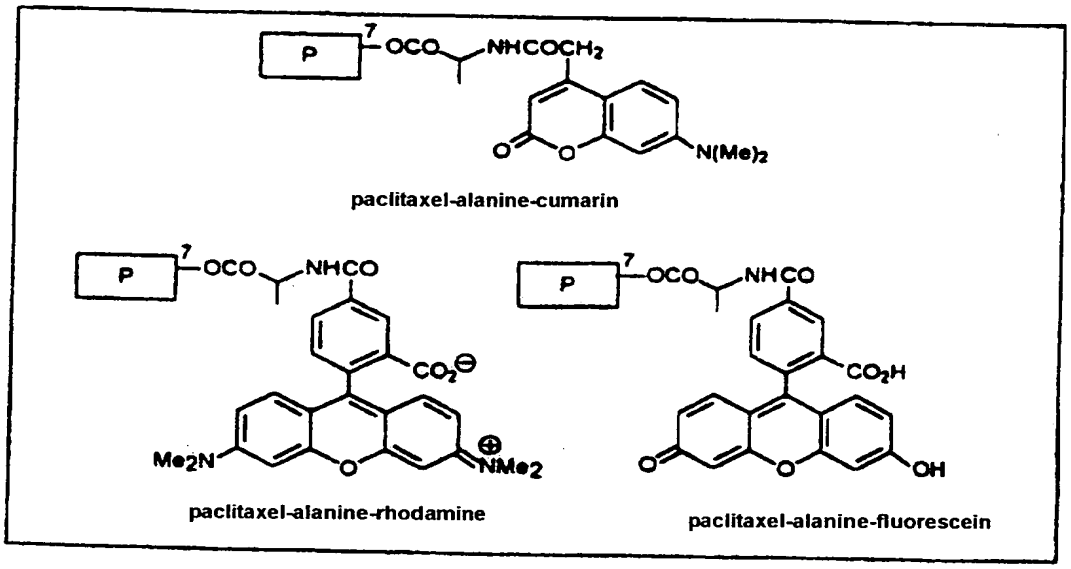
5. Description of the diagram

The diagram shows the molecular structures of paclitaxel and docetaxel, the corresponding molecules containing the spacer $-CO-R^1-NH_2$ in position 7, and the structure resulting from attaching a generic dye R^2–dye by reaction with the NH_2 group of the spacer, along with the possible groups R^2 with selective reaction with primary amino groups. The lower part of the diagram shows the structures of the three derivatives of paclitaxel which serve as an example in this invention, with the chromophore of a cumarin, a rhodamine or fluorescein in the molecule.


OAc
OH
PhCONH
Ph
OH
OH OBz
OAc
paclitaxel (taxol)
abbreviated formula
P
7
OH
t-BuOCONH
docetaxel (taxotere)
abbreviated formula
D
abbreviated formula of the taxanes paclitaxel and docetaxel
T


R2
dye
T
OCO-(R1)-NH2
taxane-spacer
OCO-(R1)-NH-CO
taxane-spacer-dye
R1 = carbonated chain, linear or branched, saturated or unsaturated, from 1 to 18 carbon atoms, or phenylene group, free or substituted.
R2 =
succinimidylester
X=C=N—
isothiocyanate
(X = S)
or thiocyanate
(X = O)
XCO—
carboxylic acid
(X=HO)
or its halides
(X=halogen)
XSO2—
sulphonic acid
(X=HO)
or its halides
(X=halogen)
abbreviated formula for a dye remnant
dye

5



6. Examples of embodiment

By way of illustration, and without being considered as a limitation on the scope of the present patent, illustrated below are some examples of the chemical attachment of three dyes, a cumarin, a rhodamine and a xanthene, to position 7 of the molecule of paclitaxel, via an L-alanine spacer, along with a practical example of one of them, the derivative with the fluorescein group, for the visualisation of the cellular microtubules. These three fluorophores have been chosen because they display chemical, spectroscopic and photophysical properties that are optimum for the ends sought in the present invention: high coefficients of absorption at wavelengths away from the intrinsic absorption of proteins and close to the emission maxima of commercially available lasers, along with high yields in the emission of fluorescence and high value of emission polarisation (anisotropy).

Example 1: *Obtention of paclitaxel-alanine-cumarin* (see formula)

To an unpurified solution of 7-(L-alanyl)paclitaxel (10 mg, 10.8 mmol)

(obtained from paclitaxel, with a total yield of 70 %, basically following the procedure described in Mathew et al., *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 145), and triethylamine (15 µL, 108 µmol) in dioxane (1 mL) was added another solution of commercial succinimidyl 7-dimethylaminocumarin-4-acetate (5.6 mg, 16.2 µmol) in dioxane (0.5 mL). After stirring for 24 hours at ambient temperature in the dark, the solvent was eliminated in vacuo. The raw paclitaxel-analine-cumarin product was purified by preparative thin layer chromatography (silica gel, ethyl acetate/dichloromethane 1:1 as eluent). Yield: 9.5 mg (77 %). Melting point: 182-185 °C. Purity by high performance liquid chromatography (HPLC) > 96 % (column C-4, from 20 to 80 % of acetonitrile in water as eluent). Solubility in water: 1 µM. The product was identified by mass spectrometry with fast atom bombardment (MS-FAB*) and by proton nuclear magnetic resonance.

Example 2: *Obtention of paclitaxel-alanine-rhodamine* (see formula)

To an unpurified solution of 7-(L-alanyl)paclitaxel (10 mg, 10.8 mmol) (obtained as stated above) in a mixture of dimethylformamide (1 mL) and aqueous buffer of pH 9 (carbonate/bicarbonate) (1 mL) was added another solution of commercial succinimidyl tetramethylrhodamine-4'-carboxylate (8.6 mg, 16.2 mmol) in the same mixture of solvents (1 mL). After stirring for 2 hours, the solvent was separated in vacuo and the raw paclitaxel-analine-rhodamine product was purified by preparative thin layer chromatography (silica gel, ethyl acetate/dichloromethane 1:4). Yield: 7.9 mg (55 %). Purity (by HPLC, conditions as above) > 92 %. The product was identified as above.

Example 3: *Obtention of paclitaxel-alanine-fluorescein* (see formula)

Following the same conditions, proportions and purification method as in the case of obtaining paclitaxel-alanine-rhodamine, 8.0 mg (60 %) of product was obtained. Melting point: > 300 °C. Purity (HPLC) > 92 % Solubility in water: 300 µM (solubility of paclitaxel in the same medium: 5 µM, according to Nicolaou et al., *Nature* **1993**, *364*, 464). The product was identified by above.

Example 4: *Observation by means of fluorescence microscopy of the cellular microtubules with the aid of the vital dye paclitaxel-alanine-fluorescein*

Cells PtK2 were treated with the paclitaxel-alanine-fluorescein derivative (1 µM), they were washed with a saline solution of phosphate buffer, mounted

without fixing in a buffer solution of 0.13 M glycine of pH 8.6, sodium chloride 0.20 M and 70% glyerine (as described by Inés et al., *Cancer Res.* **1994**, *54*, 75) and were observed with an epi-fluorescence microscope. The cytoplasmic microtubules were perfectly visible as were the spindles in the cells in the process of division. The quality of the image was at least similar to that obtained by means of habitual processes of indirect immunofluorescence with anti-tubulin antibodies on fixed cells, with individual microtubules being distinguished.

7. Claims

1.- Fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel with antineoplasic activity, method for obtaining same and their applications. These derivatives are characterised in that they contain in their molecule a luminescent chromophore group bonded to the original molecule of the taxane via position 7 by means of a spacer.

2.- Fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel with antineoplasic activity, method for obtaining same and their applications, according to claim 1, characterised in that the method for obtaining them possesses two consecutive stages. In stage one the alcohol group in position 7 of the taxane is selectively esterified with a carboxylic acid having a primary amino group in its molecule. In stage two the amino-derivative of the taxane, obtained in the first stage, is made to react with a dye which possesses in its molecule a group with selective reaction with primary amino groups. The primary amino and carboxylic acid group in the amino acid are separated by a chain of from 1 to 18 carbon atoms, linear or branched, or by a phenylene group, with or without alkyl substituents. Said amino acid can be any of the known natural α-L-amino acids, such as glycine, alanine, proline, etc., their D-isomers, the corresponding racemic mixtures, or any compound which simultaneously possesses the carboxylic acid and primary amino groups in its molecule. The group with selective reaction with primary amine groups can be isocyanate, isothiocyanate, succinimidylester, carboxylic acid or halide of carboxylic acid and sulphonic acid or halide of sulphonic acid. The dye with the above reactive group of primary amines is always a derivative of another dye, chosen from among those of the families of xanthene dyes: (fluorescein, Floxin, Eosin, Erythrosin, Rose Bengal), thiacines (thionine, Methylene Blue, Azure A, Azure B), rhodamines (Rhodamine B, Rhodamine 3B, Rhodamine 19, Rhodamine 6G, Rhodamine 101, Rhodamine 123, Texas Red), cumarins, porphyrins, aminonaphthalenes, polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene, anthracene, phenanthrene, pyrene), linear or branched polyenes with a minimum of three conjugated double bonds and complexes of pyrromethene with boron trifluoride.

3.- Fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel with antineoplasic

activity, method for obtaining same and their applications, according to claim 1, characterised in that they possess similar bioactivity and higher solubility in water than the taxane from which they derive.

4.- Fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel with antineoplasic activity, method for obtaining same and their applications, according to claim 1, characterised in that they emit fluorescence or phosphorescence, or in that they generate cytotoxic chemical species on being illuminated, when attached to the microtubules system of benign or malignant cells.

5.- Fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel with antineoplasic activity, method for obtaining same and their applications, according to claim 1, characterised in that the electronic properties of the chromophore group existing in their molecule are suitable for new methods of analysis and new diagnostic techniques for cancerous diseases, and for anticancer photodynamic therapy.

6.- Fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel with antineoplasic activity, method for obtaining same and their applications, according to claim 1, characterised in that the properties of the chromophore group existing in their molecule are suitable for their application, by means of optical fluorescence techniques, in the observation, classification and monitoring of cells or living cellular organisms, without alteration of the biological functions, by means of the specific fluorescent staining of their cytoskeleton, flagella, cilia or other structures which contain or which are microtubules.

7.- Fluorescent derivatives of paclitaxel and docetaxel with antineoplasic activity, method for obtaining same and their applications, according to claim 1, characterised in that their chemical and fluorescent properties are suitable for new methods of analysis and diagnosis of diseases produced by unicellular microorganisms, due to alterations of the nervous tissue and, in general, due to any other physical, chemical and/or biological process which can be detected via the specific observation of the microtubules system and of its changes and transformations.